

令和6年度 厚生労働科学研究費
(循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策総合研究事業)

呼吸器疾患につながりうる影響指標の探索

分担研究報告書

研究分担者	大坪和明	熊本大学	研究協力者	橋本弘司	熊本大学
研究分担者	首藤 剛	熊本大学	研究協力者	河野圭亮	熊本大学
研究分担者	黒澤 一	東北大学	研究協力者	尾上あゆみ	熊本大学
研究分担者	緒方裕光	女子栄養大学			
研究代表者	大森久光	熊本大学			

研究要旨

本研究は、加熱式たばこ喫煙者・受動喫煙者の健康影響を評価することを目的とした。本研究では、先行研究での受動喫煙の評価方法に加えて、曝露指標（尿中ニコチン代謝物）、臨床指標（炎症、呼吸機能）および肺への影響指標を分析し、加熱式たばこの使用によって影響の生じるバイオマーカーの抽出および選定を目指すことに特色がある。加熱式たばこによる受動喫煙が人の健康に及ぼす影響をバイオマーカーから予測し、評価することを最終目的とする。

本研究は、「項目1：加熱式たばこ使用による受動喫煙曝露の実態調査（長期間の臨床指標への影響の評価）」および「項目2：呼吸器疾患につながりうる影響指標の探索」で構成されている。本分担研究は項目2を担当する。

本分担研究では、微量血清サンプルからのmiRNAプロファイリングの実験条件の設定のための検討を行った。微量血清サンプルからのmiRNAプロファイリングの実験条件の設定のため、異なる被検者12名から取得した血清サンプル(200ml~1ml)からmiRNA抽出を行った。その結果、健診の残余検体で得られる検体量から本解析に必要なmiRNAを分解することなく十分量取得できることが確認された。さらに、取得したmiRNAサンプルから次世代シーケンサー解析用のライブラリーを作成し、そのサイズ分布及び定量解析から解析に適したライブラリーを作成できることを確認した。次世代シーケンサーによる12サンプルの解析から、各血清サンプル中のmiRNAプロファイルの取得に成功した。

令和6年度は、初年度にリクルートした参加者の中で胸部CT検診を受診した者66名（肺気腫なし11名、肺気腫あり55名）を対象として呼吸器疾患につながり得る指標であるフィブリン-3、SP-Dの解析を実施した。さらに、胸部CT検診受診者24名（肺気腫なし6名、肺気腫あり18名）を対象として次世代シーケンシング（NGS：Next Generation Sequencing）によるmiRNAの発現プロファイル解析を実施した。取得したmiRNAプロファイル結果についてクラスター分析（主成分分析）を行い、各群を分類しうるマーカーmiRNAの探索のための基礎データを取得した。

令和7年度は、引き続きすでにリクルートした研究対象者についてフィブリン-3、SP-D レベルの解析を進めるとともに、肺の繊維化の指標となる KL-6 レベルを解析し、呼吸機能との相関性を検討するための補足データを取得する。加えて、NGS による miRNA のプロファイリングおよびクラスター解析数を増加し、より精度の高いデータを取得する。

これら取得データに基づいて曝露指標（尿中ニコチン代謝物）、臨床指標（特に呼吸機能）の経年変化および炎症指標（高感度 C 反応性蛋白、白血球）との関連について分析する。とりわけ、肺胞破壊や COPD の病態マーカーである Fibulin-3 及び SP-D との相関性を解析し、その結果及び健康診断の結果と miRNA を指標とした解析結果との相関性を解析することで、呼吸器疾患につながり得るバイオマーカーを見出し、その評価方法を開発する。

開発した方法を用いて、順次、加熱式たばこの使用および受動喫煙の評価を行う。さらに、国内で主に使用されている複数のメーカーの加熱式たばこについての解析を行う。

A. 研究目的

加熱式たばこによる受動喫煙の健康影響について明らかにすることが目的である。

これまで、紙巻たばこについては受動喫煙による健康影響が明らかになっているが、加熱式たばこについては主流煙にニコチンや発がん性物質が含まれていることは明らかであるものの、現時点では受動喫煙による長期的な健康影響を予測することは難しい状況である。このような状況を踏まえ、健康増進法の改正において、加熱式たばこによる受動喫煙が人の健康に影響を及ぼす調査研究を一層推進し、可能な限り早期に結論を得よう附帯決議がなされた。

申請者らは、日本医療研究開発機構 (AMED) (2018-19 年) および厚生労働科学研究費補助金 (2019-22 年) の助成を受け、父親が加熱式たばこを使用している非喫煙家族（配偶者と子供）の尿中ニコチン代謝物は、非喫煙・非使用家族に対して有意に高値を示し、受動喫煙による曝露の実態を明らかにした。

(Onoue A, Omori H. et al. *Int J Environ*

Res Pub Health. 2022, 19, 6275.)

本研究では、**曝露指標**に加えて、**影響指標**を用いた評価方法の開発を行い、加熱式たばこによる受動喫煙が人の健康に及ぼす影響をバイオマーカーから予測し、評価することを最終目的として、以下の4点について検討する。

- ① 呼吸機能、炎症、尿中のニコチン代謝物など、加熱式たばこの使用によって影響の生じるバイオマーカーの抽出・選定
- ② 疾患につながり得るバイオマーカーを用いた、加熱式たばこの喫煙及び受動喫煙の評価方法の開発
- ③ 開発した方法に基づいて実施する加熱式たばこの喫煙及び受動喫煙の評価
- ④ 国内で主に使用されている複数のメーカーの加熱式たばこについての解析

令和 5~6 年度に各バイオマーカーからの加熱式たばこによる受動喫煙の健康影響

の予測の解析を行い、令和 7 年までにその評価の達成を目指す。

B. 研究方法

項目 2：呼吸器疾患につながりうる影響指標の探索

(首藤班員、河野研究協力者、大坪班員、橋本弘司研究協力者、黒澤班員、緒方班員、尾上協力者、大森代表者)

【曝露指標の分析】

・尿中ニコチン代謝物: コチニン、3-ヒドロキシコチニン (3-OHCot)

依存性化学物質。過去 2-3 日間のニコチン曝露量を反映。

・尿中たばこ特異的ニトロソアミン類: NNAL: 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone

たばこ製品由来の発がん性物質。中期的な曝露マーカー (半減期 15-45 日)

・トリプル四重極型 (QQQ) LC-MS (liquid chromatography [LC] / mass spectrometry [MS]) を用いて測定する。

【呼吸器疾患につながり得る影響指標の分析】

・fibulin-3: 生体を構成する殆ど全ての細胞が分泌する細胞外小胞が、細胞機能の制御や疾患の進展に大きく寄与することが報告され、現在、血液や尿等の体液を利用した疾患診断(リキッドバイオプシー)として、世界的に注目されている。慢性閉塞性肺疾患 (COPD: Chronic Obstructive Pulmonary Disease) 患者血清のプロテオ

ミクス解析により、エラスチン繊維の変性・破壊を反映する細胞外小胞タンパク質として同定された肺胞破壊(肺気腫)関連バイオマーカーである。(Koba T, *ERJ open research*, 2020)

・SP-D: 肺の II 型肺胞上皮細胞より産生・分泌される肺特異的糖タンパク質である。SP-D 遺伝子の SNPs(Rs721917, Met11Thr) が血清中の SD-P レベルの低下を招く、COPD、肺気腫と相関、血清 SP-D が喫煙者で高値、COPD 患者で高値などが報告されており、COPD の病態バイオマーカーである。

・次世代シーケンシング (NGS: Next Generation Sequencing) による miRNA の発現プロファイル解析による病態モニタリング

C. 結果

項目 2：呼吸器疾患につながりうる影響指標の探索

(首藤班員、河野研究協力者、大坪班員、橋本弘司研究協力者、黒澤班員、緒方班員、尾上協力者、大森代表者)

【曝露指標の分析】

トリプル四重極型 (QQQ) LC-MS にて、測定対象であるニコチン、コチニン、3-OH コチニン、NNAL が実際に測定可能かどうか、またその測定可能な濃度域の検討を行った。上記 4 種類の化合物の標準物質、安定同位体である d3-コチニン、13C6 NNAL を濃度別に流し、検量線の作製に成功した。

【呼吸器疾患につながり得る影響指標の分析】

微量血清サンプルからの miRNA プロファイリングの実験条件の設定のための検討を行った。

微量血清サンプルからの miRNA プロファイリングの実験条件の設定のため、異なる被検者 12 名から取得した血清サンプル (200 μ l~1ml) から miRNA 抽出を行った。

その結果、健診の残余検体で得られる検体量から本解析に必要な miRNA を分解することなく十分量取得できることが確認された。次に、取得した miRNA サンプルから次世代シーケンサー解析用のライブラリーを作成し、そのサイズ分布及び定量解析から解析に適したライブラリーを作成できることを確認した。次世代シーケンサーによる 12 サンプルの解析から、各血清サンプル中の miRNA プロファイルの取得に成功した。

この手法を用いて、胸部 CT 検診受診者 24 名 (肺気腫なし 6 名、肺気腫あり 18 名) を対象として NGS による miRNA の発現プロファイル解析を実施した (表 1)。この解析から、発現上位 50 位までの miRNA において肺気腫あり検体で発現が低下している傾向が見られた。また、肺気腫あり検体のみで検出される miRNA が、発現上位 221 位以降に数多く検出されており、これらが肺気腫の病態や肺機能と関連するバイオマーカーとなる可能性がある。

また、取得した miRNA プロファイル結果についてクラスター分析 (主成分分析) を行った結果、第 1 主成分が強力な因子であることが示され (図 1)、第 1 主成分および第 2 主成分でのプロットにより、精度は劣るものの肺気腫あり、なしの検体をある程度分類しうることが示された (図 2)。さらには、主成分分析から発現上位 50 位までの

miRNA において、機能的に関連あるものがクラスタリングされる傾向が見られた (図 3)。

一方、初年度にリクルートした参加者の中で胸部 CT 検診を受診した者 66 名 (肺気腫なし 11 名、肺気腫あり 55 名) を対象として呼吸器疾患につながり得る指標であるフィブリン-3 及び、SP-D の解析を実施した。SP-D については、肺気腫ありが肺気腫なしに対して、有意に高い SP-D レベルを示すことが判明した (図 4)。

フィブリン-3 レベルに関しては、肺気腫ありで高い発現を示す検体が多く見られたが、統計学的有意差は見られなかった (図 5)。今後、解析検体数を増やすことで解析の信頼性を向上させる。

今後、加熱式使用群、紙巻喫煙群、非喫煙群について、次世代シーケンサーによる miRNA プロファイリングを行う。取得した結果についてクラスター分析を行い、各群を分類しうるマーカー miRNA を見出す。

臨床指標 (特に呼吸機能) の経年変化および炎症指標 (高感度 C 反応性蛋白、白血球) との関連について分析する。

肺胞破壊や COPD の病態マーカーである Fibulin-3 及び SP-D の解析結果及び健康診断の結果と miRNA を指標とした解析結果との相関性を解析することで、呼吸器疾患につながり得るバイオマーカーを見出し、その評価方法を開発する。

開発した方法を用いて、順次、加熱式たばこの使用および受動喫煙の評価を行う (目的③)。さらに、国内で主に使用されている複数のメーカーの加熱式たばこについての解析を行う (目的④)。(全班員)

研究成果は順次、学会発表、論文を作成し公表する。

E. 結語

健診の残余検体で得られる検体量から本解析に必要な miRNA を分解することなく十分量取得できることが確認された。

さらに、取得した miRNA サンプルから次世代シーケンサー解析用のライブラリーを作成し、そのサイズ分布及び定量解析から解析に適したライブラリーを作成できることを確認した。

次世代シーケンサーによる解析から、各血清サンプル中の miRNA プロファイルの取得に成功した。

初年度にリクルートした参加者の中で胸部 CT 検診を受診した者 66 名（肺気腫なし 11 名、肺気腫あり 55 名）を対象として NGS による miRNA のプロファイリングに成功した。肺気腫の有無によるプロファイルの変化や肺気腫に応じて出現する miRNA を検出することができた。また、取得した発現プロファイルから主成分分析により、クラスター解析を行なった。

また、肺胞破壊や COPD の病態マーカーである Fibulin-3 及び SP-D の解析を実施し、肺気腫あり検体で高くなることを示す結果を得た。

今後、臨床指標（特に呼吸機能）の経年変

化および炎症指標（高感度 C 反応性蛋白、白血球）との関連について分析する。また、Fibulin-3 及び SP-D の解析結果及び健康診断の結果と miRNA を指標とした解析結果との相関性を解析することで、呼吸器疾患につながり得るバイオマーカーを見出し、その評価方法を開発する。

開発した方法を用いて、順次、加熱式たばこの使用および受動喫煙の評価を行う（目的③）。さらに、国内で主に使用されている複数のメーカーの加熱式たばこについての解析を行う

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表（本研究に関連するもの）
なし。
2. 学会発表
なし。

H. 知的財産権の出願・登録状況

この研究において、知的財産権に該当するものはなかった。

資料1 表1. NGSによるmiRNAの発現プロファイル（その他：参照）

資料2 図1-3. クラスタ分析（主成分分析）（その他：参照）

図4. SP-D レベル（その他：参照）

図5. Fibulin-3 レベル（その他：参照）